

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

BIOLOŠKI ODSJEK

DETEKCIJA GENETIČKOG KIMERIZMA KOD ČOVJEKA

DETECTING GENETIC CHIMERISM IN HUMANS

SEMINARSKI RAD

Ivana Keršić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular biology)

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2019

## SADRŽAJ:

### 1. UVOD

### 2. KLASIFIKACIJA DOSAD OPISANIH KIMERA

#### 2.1. Prirodne kimere

#### 2.2. Umjetne kimere

#### 2.3. Mikrokimere

### 3. DETEKCIJA KIMERIZMA

#### 3.1. Klinički i patološki pregledi

#### 3.2. Serologija krvnih grupa

#### 3.3. Citogenetička analiza

#### 3.4. Molekularna tipizacija polimorfnih lokusa

### 4. VAŽNOST I IMPLIKACIJE POUZDANE DETEKCIJE KIMERIZMA

#### 4.1. Transplantacija

#### 4.2. Bolesti

#### 4.3. Ekspresijski kimerizam

#### 4.4. Kimerizam u forenzičkoj analizi DNA

### 5. ZAKLJUČAK

### 6. LITERATURA

### 7. SAŽETAK

### 8. SUMMARY

## **1.UVOD**

„...ona prastara bića mitologije, kao Himera, Skila, Kerber, i druga o kojima se govori da su bila mnogi prirodni oblici koji su srasli u jedno.“ (Platon, 428-348 pr. Kr.)

Pojam kimere vuče porijeklo iz antičkog doba, a predstavlja mitološko biće naizgled sačinjeno od dijelova više različitih životinja (prikaz na slici 1). Danas, u kontekstu biologije i medicine, kimera označava pojavu koja postaje sve važnija i češća tema znanstvenih istraživanja. Riječ je genetičkoj kimeri, organizmu sačinjenog od genetski različitih staničnih linija (Yunis i sur. 2007).

Sve do druge polovice 20. stoljeća, jedini poznati primjeri kimerizma kod čovjeka bili su ograničeni na stanice krvi. Članak objavljen 1953. (Dunsford i sur. 1953.) opisuje slučaj žene koja je, pri pokušaju doniranja krvi, pokazala krvnu grupu A i 0, rezultat koji se isprva doimao kao slučaj osobe krvne grupe A koja je nedavno primila transfuziju od donora grupe 0. No, žena u pitanju nije nikada primila transfuziju. Ustanovljeno je da je žena imala brata blizanca krvne grupe A<sub>1</sub> koji je umro kao tromjesečno dijete. Analizom sline uočilo se da tu prisutne stanice žene imaju antigen grupe 0, te je prozvana prvim čovjekom sa dvojnou krvnom grupom.

1962. objavljen je rad u kojem je opisana ljudska kimera za sva testirana tkiva, i to na primjeru hermafroditne djevojčice (Gartler i sur. 1962) sa vidljivom asimetrijom boje očiju (heterochromia simplex) i uočenim ovotestisom na desnoj strani tijela kao anatomskim pokazateljem prisutnosti populacija XX i XY stanica razlučenih pri kariotipizaciji. Pojedinaac se opisao kao primjer 'ekstenzivnog mozaicizma', ne kimerizma, a autori su predložili da je stanje najvjerojatnije rezultat dvostruke oplodnje.

Današnja distinkcija pojmova kimerizma i mozaicizma se temelji na razlici u mehanizmima postanka, koji su prije nekoliko desetljeća još uvijek bili slabo proučavani i poznati te je tek kasnije, daljnjim proučavanjem, u struci došlo do razdvajanja pojmova i prestanka naizmjenične uporabe istih. Otkriće mozaicizma ili kimerizma u pojedincu se najčešće događalo uočavanjem nedosljednosti prilikom određivanja krvne grupe ili nedosljednosti komplementa spolnih kromosoma (Malan i sur. 2006).

Pojam mozaicizma podrazumijeva nastanak iz jedne zigote, dok genetički kimerizam podrazumijeva fuziju dviju genetički različitih zigota u jedan embrio (Conlin i sur. 2010). Pri embriogenezi mozaika porijekom iz jedne zigote, tijekom brze diobe stanica može doći do nasljedne promjene (mutacija DNA, epigenetske promjene, promjene broja kromosoma) unutar pojedine stanice čije stanice kćeri daljnjom diobom uspostavljaju novu staničnu liniju (Wenk, 2018).

Cilj ovog rada je objasniti mehanizme i posljedice pojave ljudskih kimera, ukazati na poteškoće u njihovoj detekciji i na kraju spomenuti neka od rješenja koja predstavljaju brže, efikasnije ili preciznije metode detekcije.



Slika 1. Prikaz kimere na apulijskom tanjuru, 350-340. pr. Kr. Preuzeto sa [https://en.wikipedia.org/wiki/Chimera\\_\(mythology\)#/media/File:Chimera\\_Apulia\\_Louvre\\_K362.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Chimera_(mythology)#/media/File:Chimera_Apulia_Louvre_K362.jpg).

## **2. KLASIFIKACIJA DOSAD OPISANIH KIMERA**

Tijekom više desetljeća proučavanja kimera od strane liječnika, serologa, citogenetičara i molekularnih biologa predložena je klasifikacija dosad opisanih slučajeva ljudskih kimera. Jedna od predloženih razlikuje 'prirodne' kimere koje nastaju spontano, 'umjetne' kimere nastale ljudskom intervencijom putem medicinskih zahvata i relativno nedavno opisane mikrokimere (Wenk, 2018; Tablica 1.)

| Prirodne kimere    | Umjetne kimere                 | Mikrokimere         |
|--------------------|--------------------------------|---------------------|
| Blizanačke (krvne) | Transplantacijske ('namjerne') | Fetalne             |
| Fuzijske           | Ijatrogene ('nenamjerne')      | Majčinske           |
|                    |                                | Blizanačke          |
|                    |                                | Stariji brat/sestra |
|                    |                                | Ostalo              |

**Tablica 1.** Klasifikacija ljudskih kimera s obzirom na dosadašnje opisane slučajeve

### **2.1. Prirodne kimere**

Takozvane spontane kimere, podrazumijevaju embrionalne stanice porijeklom iz dviju različitih zigota koje daljnjom diobom proliferiraju u dvije stanične populacije varijabilnog vremena opstanka u organizmu, pri čemu same dizigotne stanice mogu biti prisutne u različitim tkivima u različitim omjerima. Ova klasa se odnosi na spontano nastale kimere prilikom embriogeneze blizanaca i kao takva nije rezultat gestacije ili poroda (Boklage, 2006).

**Blizanačke (krvne) kimere** su česta pojava dizigotnih blizanačkih potomaka stoke kao rezultat vaskularne anastomoze u placenti, pojave krvnih žila koje spajaju krvotok blizanaca površinski ili putem parenhima placente (Baldwin, 1994). Pri tome je moguć prijenos krvnih, matičnih i primordijalnih spolnih stanica od jednog do drugog blizanca i obrnuto (Van Dijk i sur. 1996). Sličan pojava uočena je i kod čovjeka, no u usporedbi sa stokom, nije česta pojava. U

radu iz 1996. (Van Dijk i sur. 1996) ustvrđena je učestalost krvnog kimerizma kod 8% testiranih blizanaca, odnosno čak 21% testiranih trojki, što je sugeriralo mnogo veću učestalost pojave nego se dotad smatralo. Analiza je napravljena pomoću fluorescencijske tehnike detekcije eritrocitnog kimerizma, koristeći fluorescencijske mikrosfere obložene antimunoglobulinom G, a tehnika je razvijena 1998. (de Man i sur. 1988). Većina zabilježenih blizanačkih kimera otkrivenih analizom krvi nikada nije potvrđena u ostalim tkivima. S prolaskom vremena se pokazalo da većina placenti monokorionskih jednojajčanih blizanaca ima vaskularnu komunikaciju koja može biti put izmjene krvi među blizancima (van den Wijngaard i sur. 2007). Dugo vremena se smatralo kako je monokorionska placenta dokaz monozigotnih blizanaca, no upravo proučavanjem kimera u slučajevima dizigotnih blizanaca ta ideja je odbačena (Boklage, 2006; Chen i sur. 2013).

**Fuzijske kimere** su posljedica oplodnje dviju zigota različitim spermalnim stanicama i potom fuzijom tih zigota u jedan organizam (Tippett, 1983). Drugi nazivi poput disperme kimere bili su u upotrebi dok još nije bio siguran doprinos majčinskih spolnih stanica, a naziv tetragametne kimere se ustalio nakon dokaza prisustva genoma dviju jajnih stanica (De la Chapelle i sur. 1974). Fuzijske kimere se eksperimentalno mogu proizvesti u miša u bilo kojem trenutku od stadija zigote do rane blastociste (Tarkowski, 1998). Prvi slučajevi su primjećeni i opisani na hermafroditima i pojedincima nejasnih primarnih spolnih obilježja (Gartler, 1962), a do danas je opisano već na desetke slučajeva, uz mogućnost da ih je u populaciji još i više (Draper, 2018).

## 2.2. Umjetne kimere

Kimere ove klase uključuju transplantacijske (namjerne) kimere nastale kao posljedica medicinskog postupka (poput transfuzije krvi, presađivanja koštane srži, presađivanja tkiva ili organa) i ijatrogene (nenamjerne) kimere slučajno nastale kao posljedica zahvata, poput medicinski potpomognute oplodnje.

**Transplantacijske kimere** su primile stanice od jednog ili više krvnog ili tkivnog donora i kao takve mogu biti nosioci dviju ili više genetički različitih staničnih linija. Za razliku od prirodnih kimera koje su imuno tolerantne na svoje različite stanične linije, primatelji često nisu tolerantni na alogenske transplantate. U takvim uvjetima, brojnost populacije donorskih stanica

može varirati s vremenom, pri čemu donorske stanice kompetiraju u nepovoljnom imunološkom okolišu primatelja. Danas, transplantati kod ljudskih pacijenata su testirani za bolest i usklađeni antigenima primatelju (Wenk, 2018).

**Ijatrogene kimere** su pojedinci čiji je kimerizam nastao neplanirano, kao slučajna posljedica medicinskog zahvata, poput pojave putujućih leukocita koji migriraju nakon transplantacije organa, opstaju u organizmu i dovode do kimerizma (Starzl i sur. 1997). Novija pojava koja zahtjeva daljnje istraživanje su kimere nastale kao posljedica medicinski potpomognute oplodnje. Prilikom postupka umjetne oplodnje (*in vitro fertilisation*, IVF) dva ili više embrija unose se u maternicu kako bi se povećale šanse za uspješnu uspostavu trudnoće. Pri takvom postupku značajno rastu šanse pojave blizanaca ili multiplata, kako navode studije i radovi koji se pojavljuju sve češće. Posebice rastu šanse pojave monokorionskih dizigotnih blizanaca povezanih sa pojavom prirodnih blizanačkih kimera (Fauser i sur. 2005; Miura i Niikawa, 2005).

### 2.3. Mikrokimere

Mikrokimerizam je opisan u slučajevima gdje je populacija stanica drugog genoma vrlo mala (Gammill i Nelson, 2010). Konsenzus oko postotka populacije stanica kojim se definira mikrokimerizam nije još dogovoren, neki autori navode <1% kao granicu (Wenk, 2018), a drugi <5% kao granicu (Draper, 2018). Prirodne mikrokimere primarno nastaju kao rezultat izmjene materijala između majke i ploda tijekom trudnoće te se status mikrokimere može zadržati čak desetljećima (Gammill i Nelson, 2010).

**Fetalni mikrokimerizam** javlja se kod žena u čijoj cirkulaciji i tkivima fetalne stanice opstaju godinama nakon same trudnoće. Fetalne stanice su semialogenske naspram majke, jer je polovica genoma fetalnih stanica porijeklom od oca i kao takve mogu prouzročiti imunološki odgovor majke (Lissauer i sur. 2009). U većini opisanih slučajeva detektirane su fetalne stanice muškog potomka pomoću sonde za DNA na Y kromosomu, a interes za pronalaskom i istraživanjem ovakvih fetalnih mikrokimera raste zbog mogućih implikacija na zdravlje žene (Bianchi i sur. 2001).

**Majčinski mikrokimerizam** pokazuju osobe u čijem organizmu stanice njihove majke opstaju nakon poroda, moguće i do odrasle dobi, kod imunodeficientnih i imunokompetentnih

pojedina. Prva proučavanja su se vodila na imunodeficientnim pojedincima, poput onih oboljelih od skleroderme, no daljnjim istraživanjem novijim PCR tehnikama majčinski mikrokimerizam se uočio u odrasloj dobi i kod zdravih, imunokompetentnih pojedinaca čak i kod postojanja HLA inkompatibilnosti. Ponovno se dolazi do pitanja kakav je mogući utjecaj majčinskih stanica i mikrokimerizma na razvoj pojedinca, s obzirom da je fetus izložen majčinskim stanicama još dok se imunološki sustav razvija (Maloney et al., 1999).

**Blizanački mikrokimerizam** uglavnom nastaje mehanizmima opisanim kao i kod klase prirodnih kimera, ali je udio populacije disparatnih stanica vrlo mala. Uz to, blizanac donor može blizancu primatelju donirati značajan broj stanica u koštanu srž, čija populacija s vremenom pada na vrijednost u definiciji mikrokimerizma. Na kraju, još jedan hipotetski mehanizam bi bio ulazak stanica jednog blizanca transplacentalnom cirkulacijom u krvotok majke i tom cirkulacijom mogu završiti u drugom blizancu (Wenk, 2018).

Ostali oblici mikrokimerizma su još slabo istraženi, ali postoje pretpostavke na temelju indirektnih dokaza, da zbog postojanja fetalnog mikrokimerizma, majka može prenijeti fetalne stanice prethodnog potomka na nove potomke u budućim trudnoćama (Dierselhuis i Goulmy, 2013).



### **3. DETEKCIJA KIMERIZMA**

Prvi opisani slučajevi kimerizma otkriveni su zbog nedosljednosti pri određivanju krvne grupe (Dunsford i sur. 1953), a to je čak i danas najčešći način otkrivanja kimera. Vidljive asimetrije fizičkog fenotipa poput različite boje očiju (Slika 2), specifičnih uzoraka pigmentacije kože (Slika 3) i nejasnoće izgleda primarnih spolnih obilježja (Gartler, 1962) rijetki su vidljivi fizički simptomi prirodnog kimerizma. Ipak, ova obilježja ne moraju nužno biti definitivni pokazatelji kimerizma jer mogu nastati kao posljedica nekih drugih uzroka, poput različitih vrsta genetičkih mutacija (Gladstone, 1969; Thomas i sur. 1989; Yordam i sur. 2001).



Slika 2. Heterokromija kod očiju djeteta, preuzeto sa [https://howlingpixel.com/en/Heterochromia\\_iridum](https://howlingpixel.com/en/Heterochromia_iridum).



Slika 3. Neuobičajan uzrak pigmentacije kože abdomena tetragametne kimere, preuzeto sa <https://science.howstuffworks.com/life/genetic/chimerism-be-own-twin.htm>.

Općenito, detekcija kimerizma može se provesti na 4 načina: klinički i patološki pregledi, serologija krvnih grupa, citogenetička analiza, te molekularna tipizacija polimorfnih lokusa (Wenk, 2018).

### 3.1. Klinički i patološki pregledi

Fizičke asimetrije u fenotipu ne mogu poslužiti kao sigurna determinacija kimerizma, ali predstavlja prvi korak u dijagnostici kimerizma. U većini slučajeva se radi o nekoj vrsti anomalije spolnih obilježja. Dosad je zaključeno kako 13% slučajeva pravih hermafrodita (stanje pri kojem je u pojedincu prisutno testikularno i ovarijsko tkivo, (Malan et al., 2006), zapravo predstavljaju posljedicu prirodnog 46,XX/46,XY kimerizma (Sperling, 2008). Prema Freiberg i sur. (1988) ovakav kimerizam dosad je potvrđen na pojedincima raznovrsnih fenotipskih obilježja i simptoma, uključujući:

- hipospadija – pomak otvora uretre na ventralnu stranu penisa od normalnog položaja na vrhu (Fitzgerald i sur. 1970)
- povremena hematurija – pojava krvi u urinu (Raspa i sur. 1986)
- ginekomastija – povećano tkivo dojki kod muškog pojedinca (Minowada i sur. 1982)
- preponska hernija – meko tkivo ili dio crijeva se probilo kroz trbušnu stijenku i ispupčuje ispod kože nanpodručju prepona (Shanfield i sur. 1973)

Uz prethodno spomenute primjere, opisane su i pojave kimerizma kod pojedinaca normalnih fenotipskih obilježja koji su neplodni (Choi et al., 2019).

Ponekad se kod pojedinaca s kimerizmom pojavljuje koža dviju različitih pigmentacija, pritom najčešće prateći Blaschkove linije koje predstavljaju specifičan uzorak kožnog mozaicizma. Poznat je primjer šestogodišnjaka koji je poslan na pregled zbog kožne pigmentacije za kojeg se ispostavilo da je dječak 46,XY/46,XX kimera (Lipsker i sur. 2008). Uzorak na koži koji prati Blaschkove linije nije jedinstven kimerizmu već se može pojaviti i kod genetičkog ili epigenetičkog mozaicizma, različitih sindroma poput McCune-Albright-ovog ili sindroma vezanih za X kromosom kod žena te dominantnih autosomalnih mutacija (Molho-Pessach i Schaffer, 2011).

Heterokromija je promjena boje i strukture irisa. 'Binokularna heterokromija' može se uočiti kod kimernih pojedinaca, ali ponovno, nije jedinstveno vezana pojava uz kimerizam. Faktori koji utječu na boju očiju su nasljedni faktori, simpatička stimulacija melanocita irisa, melanocit stimulirajući hormon (MSH) i biokemijski faktori uključeni u metabolizam melanina (Gladstone, 1969).

Mikroskopski, tkivo kimera pokazuje morfološki normalne populacije stanica, kao na primjer kod dizigotnih embrija, koje se ne mogu međusobno razlikovati. Razlike nastupaju na submikroskopskim razinama koje se mogu uočiti drugim metodama.

### 3.2. Serologija krvnih grupa

Karl Landsteiner je otkrio AB0 sustav krvnih grupa 1901., određenih AB0 lokusom na dugom kraku kromosoma 9 (9q34.1). Od tada je definirano još nekoliko sustava ljudskih krvnih grupa poput sustava MN, Rh, Kel i P sustava (Farhud i Zarif Yeganeh, 2013). Miješana aglutinacija (*mixed-field agglutination*) je djelomična aglutinacija (sljepljivanje većih čestica ili stanica u veće ili manje nakupine djelovanjem antitijela) pri čemu dio stanica koje ne aglutiniraju ostaju u suspenziji, a dio koji je aglutinirao sedimentira. Ona nije specifična za kimerno stanje, jer se može pokazati kod osobe sa nasljeđenim A i/ili B antigenima koja je nedugo prije testiranja primila transfuziju krvi grupe 0. Ipak, važnost ovog fenomena proizlazi iz činjenice da, kao dio standardnog pretransfuzijskog testiranja, ukazala na 80% dosad opisanih slučajeva kimera (Wenk, 2018).

Tipizacija krvne grupe je nepouzdana metoda otkrivanja kimera, jer je moguće da pojedinac ne pokazuje kimerizam na površini krvnih eritrocita, nego u drugim tkivima i organskim sustavima. Nadalje, uzorci s npr. malom populacijom stanica grupe 0 među većinskim A ili B stanicama često pokazuje slabu ili gotovo nikakvu miješanu aglutinaciju. Svakako, pri pojavi miješane aglutinacije, potrebno je provjeriti anamnezu pacijenta za bilo kakve prijašnje transfuzije ili transplantacije i provesti dodatne pretrage.

### 3.3. Citogenetička analiza

Citogenetika proučava strukturu i svojstva kromosoma, njihovo ponašanje tijekom mitoze i mejoze te utjecaj na fenotip (Hare i Singh, 1979). 1956. pouzdano se utvrdio diploidni broj

ljudskih kromosoma kao 46, a razvoj tehnika pruganja je otvorio potpuno novi spektar mogućnosti proučavanja kromosoma, pri čemu je tehnika G pruganja do danas ostala najraširenija. 1986. je razvijena molekularna metoda vizualizacije kromosoma FISH (*fluorescence in situ hybridization*) kojom se pomoću fluorescentno obilježenih sonde mogu vizualizirati specifične sekvence nukleinskih kiselina u morfološki fiksiranim kromosomima, stanicama i tkivima. Ovom metodom moguće je detektirati abnormalnosti malih segmenata DNA ako se sonda nalazi na točnom mjestu, a omogućila je i kariotipizaciju jezgri stanica koje se ne dijele. Uspostavom FISH-a, dalje su se razvijale nove metode, poput spektralne kariotipizacije (SKY), višebojnog FISH-a i komparativne hibridizacije genoma (CGH).

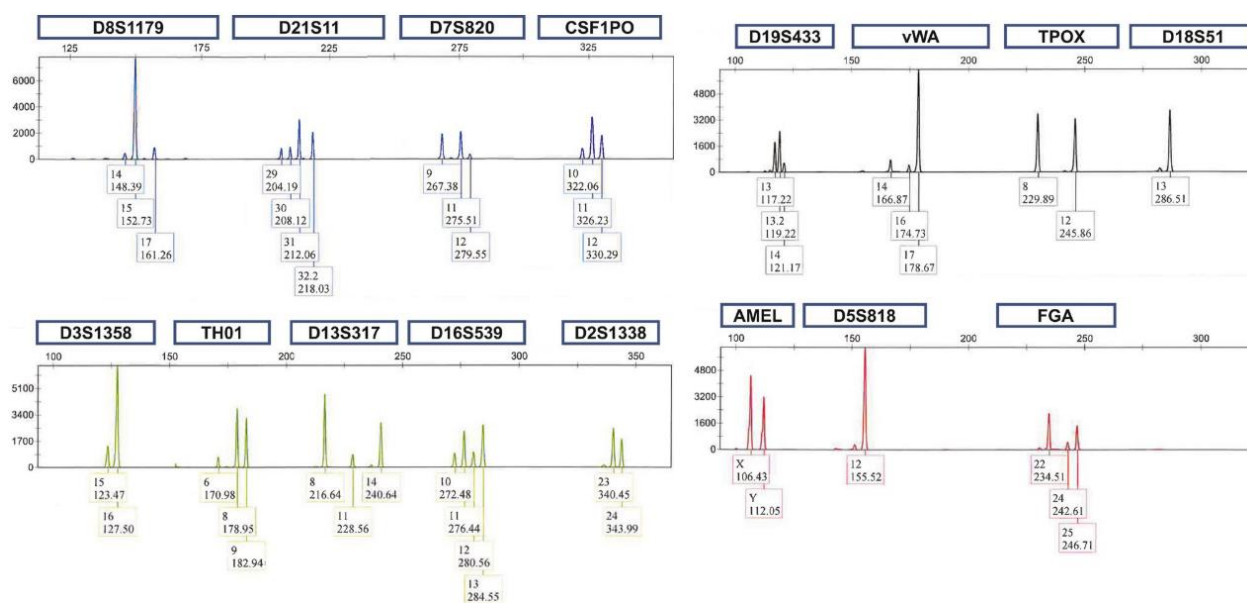
Metode detekcije kimerizma pomno su pratile razvoj citogenetičkih metoda. Dok je u samim počecima bilo moguće uočiti samo Y kromosom kao pokazatelj kimerizma u ženskih osoba, razvojem boljih tehnika pruganja i vizualizacije omogućena je detekcija nasljednih varijanti na kromosomima. Na primjer, postoji 5 nasljednih varijanti dugog kraka (q krak) Y kromosoma u populaciji koje se s velikom vjerošću prenose s oca na sina, a u slučaju da se varijante morfološki ili duljinom razlikuju među stanicama, moguće je detektirati 46,XY/46,XY kimeru. Pronalaskom dva ili više heteromorfizama na autosomima također je moguće detektirati prirodnu kimeru. Ipak, zbog količine utrošenog vremena i troška, molekularna tipizacija možda predstavlja bolju metodu identifikacije kimerizma (Wenk, 2018).

### 3.4. Molekularna tipizacija

Metode molekularne tipizacije zahtijevaju veliki broj kopija promatranog gena ili dijela kromosoma, što je moguće zahvaljujući PCR-u (*polymerase chain reaction*), neophodnom alatu moderne molekularne biologije kojeg je razvio Kary Mullis 1983. Uzorkovanjem stanica, izolacijom DNA, PCR amplifikacija DNA i analiza iste mogu jednoznačno identificirati kimeru. U sklopu nekodirajuće DNA postoje repetitivne sekvence koje nisu pod strogom regulacijom selektivnih sila evolucije kao što je kodirajuća DNA (pod uvjetom da ne komprimiraju preživljavanje jedinke). Mikrosateliti su visoko polimorfni sljedovi nekodirajuće DNA, drugog naziva STR (*short tandem repeats*) ili SSR (*short sequence repeats*), a predstavljaju uzastopna ponavljanja od 1-6 parova baza (Bagshaw, 2017). Polimorfnost leži u samoj sekvenciji i broju ponavljanja, a aleli STR lokusa se razlikuju prema broju kopija ponavljajuće sekvencije. Ova klasa molekularnih biljega se već godinama koristi u forenzici, populacijskoj genetici, mapiranju

genoma i mnogim drugim područjima. Aleli na STR lokusu su kodominantni i nasljeđuju se po Mendelovim principima, a što se veći broj lokusa analizira veća je moć razučivanja.

Prilikom analize, svaki PCR-om amplificirani alele se fluorescentno obilježava, a intenzitet fluorescencije svakog alela grafički se zabilježava pomoću elektroferograma. Kada je osoba homozigot za promatrani alel, na elektroferogramu se vidi jedan signal za taj alel, a u slučaju da je osoba heterozigot, vidljiva su dva signala. Dizigotne kimere će na jednom alelu dati 1-4 signala zbog prisutnosti po 2 kopije alela u svakoj staničnoj populaciji. Na primjer, ako su vidljiva 3 signala, to znači da je jedna stanična populacija homozigot za dani alel, a druga heterozigot, ili se jedan alel pojavljuje u obje populacije stanica (Slika 4). Neki lokusi mogu pokazati samo 2 signala, ali u slučaju kimere vrlo rijetko će lokus pokazati samo jedan signal jer bi to značilo da su svi aleli identični.



Slika 4. Elektroferogram 46,XY/46,XX kimere, 8 od 15 markera pokazuje 3 signala, 2 markera pokazuju čak 4 signala, preuzeto iz (Choi i sur. 2019)

#### **4. VAŽNOST I IMPLIKACIJE POUZDANE DETEKCije KIMERIZMA**

Proučavanje kimeri, koje predstavljaju rijedak fenomen u ljudskoj populaciji, nije se moglo razvijati značajnom brzinom upravo zbog problema detekcije. Danas, zahvaljujući raširenosti molekularnih metoda i visokog stupnja razvoja ostalih metoda, moguće je lakše no ikad pronaći kimerne pojedince. Trenutno, literatura koja se bavi kimerama uglavnom se bavi analizom pojedinačnih slučajeva i preglednih radova dosadašnjih spoznaja, a malo je izvornih istraživačkih studija. Upravo zbog poboljšanja metoda detekcije i mnogih pretpostavki o mogućim ulogama različitih oblika kimerizma u razvoju i zdravlju pojedinca, javlja se potreba za detaljnijim ispitivanjem fenomena kimerizma.

##### **4.1. Transplantacija**

Transplantacija alogenskih hematopoetskih matičnih stanica je postupak u sklopu liječenja bolesti poput urođenih metaboličkih efekata, deficijencije imunskog sustava i tumora u krvnom sustavu. Provodi se u slučaju kada pacijentu život ovisi o ovom rizičnom postupku, koji prije same transplantacije zahtijeva kemoradioterapiju (Hatzimichael & Tuthill, 2010). Iznimno je važno pratiti zdravlje pojedinca nakon zahvata, kako bi se izbjegle komplikacije poput povratka bolesti, odbacivanja presadka ili bolesti presatka (*graft-versus-host disease*, GvHD), a praćenje kimerizma nakon zahvata je važan dio ovog procesa. Nekolicina istraživanja već upućuje na važnost kvantitativne analize kimerizma kao mogućnosti ranog razlikovanja neuspješnog primanja presadka od usporenog primanja, a i mogućnost rane detekcije pacijenata sa visokim rizikom od bolesti presatka ili povratka bolesti. Smatra se kako upravo ovisno o obliku kimerizma nakon zahvata (to jest, praćenje omjera određenih staničnih populacija), može poslužiti kao vodilja za predviđanje malignih pojava nakon zahvata i pravovremeno prilagođavanje terapije kako bi se te pojave izbjegle (Khan i sur. 2004).

Transplantacija je dio tretmana bolesnika u terminalnim fazama zatajenja organa čiju uspješnost narušavaju duge liste čekanja, nuspojave, imunosupresivni lijekovi i teže preživljavanje presadka. Na temelju razmatranja kod monozigotnih blizanaca u životinja, sada već postoji nekoliko posebnih slučajeva gdje je bolesnik razvio imunotoleranciju na renalni presadak ako mu je prethodilo presađivanje hematopoetskih matičnih stanica od istog donora, to jest, preko hematopoetskog kimerizma postignuta je transplantacijska tolerancija (Sayegh i sur.

1991). Međutim, presađivanjem hematopoetskih matičnih stanica javlja se mogućnost bolesti transplantata protiv primatelja i procjenjuje se da se javlja u 15% slučajeva nakon presađivanja (Pasquini i sur. 2010). Trenutno se još uvijek radi na uspješnom protokolu indukcije i praćenja kimerizma u svrhu razvoja tolerancije na presatke koji može imati funkcionalnu kliničku primjenu (Mahr i sur. 2017).

#### 4.2. Bolesti

Sistemična skleroza (*systemic sclerosis*, SSc) autoimuna je bolest klinički slična bolesti transplantata prema primatelju, a okarakterizirana je autoimunošću, fibrozom kože i unutarnjih organa te vaskulopatijom. Primarna determinanta bolesti transplantata prema primatelju je odnos između HLA gena donora i primatelja pa se tako pojavio interes za istraživanjem mikrokimeizma i odnosima HLA gena kod autoimunih bolesti (Nelson, 2012). Studija provedena 1998. ustvrdila je značajno više koncentracije muške DNA u perifernoj krvi žena oboljele od sistemične skleroze nego kod zdravih. Oboljele žene su u većini slučajeva prethodno rodile muškog potomka kompatibilnog s vlastitom HLA klasom II, sugerirajući da podudaranje HLA između majke i djeteta povećava rizik maligne pojave. Nije još ustvrđena poveznica patogeneze bolesti i fetalnog mikrokimerizma, ali svakako predstavlja zanimljivo područje istraživanja u budućnosti (Nelson i sur. 1998).

Fetalni mikrokimerizam proučavan je i kod slučajeva autoimunih bolesti štitnjače, poput Hashimotovog tiroiditisa i Gravesove bolesti kao neke od najpoznatijih. Pretežno pogađaju žene, a rizik pojave bolesti viši je nakon porođaja. Fetalne stanice u perifernoj krvi tijekom trudnoće i neposredno nakon porođaja nisu neuobičajena pojava, ali one se u organizmu žene mogu dugotrajno zadržati, čak do 27 godina. Visoka koncentracija fetalnih stanica u tkivu štitnjače kod žena koje boluju od neke autoimune bolesti štitnjače nameću pitanje o mehanizmu koji usmjerava te fetalne stanice na migraciju i zadržavanje u tkivu štitnjače, ali zasad samo postoje hipoteze. Sama uloga fetalnih stanica u patogenezi također je još uvijek predmet rasprave. Trenutne su pretpostavke da negativan, pozitivan, ili neutralan efekt fetalnih stanica ovisi i o drugim faktorima poput vrsta stanica, okolišu tkiva u kojem se nalaze i poklapanju HLA haplotipa između majke i potomka (Lepez i sur. 2013).

Majčinski kimerizam je uočen i kod nekih autoimunih bolesti poput miozitisa, neonatalnog lupusa i dijabetesa tipa 1. Kod juvenilnog miozitisa, majčinske T stanice pronađene su u krvi i mišićima u značajno višim razinama nego kod zdrave djece te se pretpostavlja da igraju ulogu u alo-autoimunosti. Majčinske stanice, većinom srčani miociti, nađene su u miokardu djece umrle od neonatalnog lupusa za razliku od zdrave kontrolne populacije. Kao i prije, raspravlja se o ulozi majčinskih stanica kao metama imunskog odgovora, to jest u alo-autoimunosti (Nelson, 2012). Kod dijabetesa tipa 1, majčinski kimerizam u perifernoj krvi primijećen je u većem postotku nego kod zdrave djece, a u gušterači dijabetičara nađeno je više inzulin-pozitivnih majčinskih stanica. Njihova točna uloga nije još sigurna, zasad postoje pretpostavke o ulozi majčinskih stanica kao metama autoimunskog odgovora ili kao korisnim stanicama koje sudjeluju u regenerativnim procesima oštećenog tkiva (Vanzyl i sur. 2010).

Zanimljivi rezultati proizašli su iz istraživanja papilarnog raka štitnjače koji čak 2-4 puta češće pogađa žene. Identifikacijom SRY sekvenci primijećena je značajna koncentracija muških fetalnih stanica kod gotovo 50% ispitanih oboljelih žena, koje su pri tom imale barem jednu prethodnu trudnoću noseći muškog potomka. Uz to, imuno-FISH analizama uočeno je da su muške fetalne stanice bile pozitivne za CD45 marker, a negativne za MHC II antigen, sugerirajući time moguću ulogu eliminacije tumorskih stanica, a Tg pozitivne/MHC II negativne stanice bi mogle imati reparativnu ulogu (Cirello i sur. 2008). Pri tome, koncentracija fetalnih stanica u perifernoj krvi oboljelih žena pokazala se mnogo nižom nego kod zdravih osoba, sugerirajući ciljanu migraciju stanica prema oboljelom tkivu. Točni mehanizmi kojima bi fetalne stanice sudjelovale u regeneraciji tkiva i eliminaciji tumorskih stanica nisu još razjašnjeni, već predstavljaju još jednu hipotezu koja zahtijeva daljnje istraživanje (Cirello i sur. 2010).

Slične ideje i rezultati eksperimenata pojavljuju se kod studija raka dojke, oboljenja za koje je primijećeno da se češće javlja kod nerotkinja. Koristeći DYS14 gen za detekciju muških fetalnih stanica, primijećeno je da koncentracija fetalnih stanica uvelike niža kod žena s rakom dojke nego kod zdravih žena. Ovo se slaže s hipotezom prema kojoj bi alogene fetalne stanice mogle pružati zaštitu od razvoja raka dojke, predlažući aloimuni nadzor pomoću fetalnih stanica ako su sposobne prepoznati majčinske karcinomske antigene (Gadi i Nelson, 2007). Zanimljivo je da je suprotan efekt uočen kod raka debelog crijeva, gdje se paralelno istraživala prisutnost fetalnih stanica kod žena oboljelih od raka dojke i raka debelog crijeva, pri čemu su istraživači



imali pristup uzorcima krvi uzetih prije pojave bolesti. Dok je detekirana veća koncentracija fetalnih stanica kod zdravih žena nego onih oboljelih od raka dojke, suprotno je uočeno kod raka debelog crijeva. Pretpostavlja se o mogućoj autoimuno reakciji koja bi uzrokovala kroničnu upalu crijeva, što bi se poklapalo sa otprije uočenom poveznicom Crohnove bolesti i raka debelog crijeva (Kamper-Jørgensen i sur. 2012).

#### 4.3. Ekspresijski kimerizam

Genomski imprinting nužan je proces uspostave pravilnih mono-alelnih, roditeljski specifičnih uzoraka genske ekspresije u razvoju sisavaca, a uz inaktivaciju X kromosoma predstavlja najistaknutije oblike ekspresije samo jednog od dva alela po stanici. Ova dva procesa reguliraju ekspresiju 5-10% genoma sisavaca, a uključeni geni organizirani su u grupama, regulirani su *master* (krovnom) kontrolnom regijom sa više dugih nekodirajućih RNA. Pojave epimutacija kojima su ovi procesi narušeni uzrok su više sindroma poput Rettovog, Beckwith-Wiedemann, Prader-Willi i fragilnog X kromosoma (Lee i Bartolomei, 2013). Eliminacijom majčinskog gena *TRIM28*, čiji protein sudjeluje u regulaciji metilacijskih i demetilacijskih procesa, uzrokuje stohastičku demetilaciju diferencijalno metiliranih regija čime se javlja fenotipska varijabilnost za koju se smatra da je uzrokovana epigenetskim kimerizmom. Negativni učinak ove delecije ne može se kompenzirati ekspresijom s očinskog alela tijekom aktivacije zigotnog genoma. U konačnici, mišji embriji začeti u *TRIM28* deficijentnim majkama nisu preživljavali dulje od 5 dana nakon oplodnje, što se slaže s premisom o nužnosti majčinskog *TRIM28* odmah nakon oplodnje te prije, a možda čak i nakon aktivacije zigotnog genoma (Lorthongpanich i sur. 2013). Razni oblici karcinoma mogu se smatrati kimerizmom, pri čemu je došlo do genetske ili epigenetske promjene kojom se aktiviraju onkogeni sposobni promovirati rast stanica ili inaktivacijom tumor-supresorskih gena koji utišavaju rast stanica.

#### 4.4. Kimerizam u forenzičkoj analizi DNA

Forenzika je znanstvena disciplina koja se koristi u postupku identifikacije prilikom nasilnih zločina i identifikacije žrtava prirodnih katastrofa. Kimerizam kao takav predstavlja jedinstvenu pojavu koja može prouzročiti krivu interpretaciju rezultata analize, kao kod determinacije spola u slučaju da je uzorak porijeklom iz npr. 46,XX/46,XY kimere. Prilikom determinacije spola forenzičkom analizom, mogu se upotrijebiti različiti markeri. Amelogenin je

je jedan od najčešće korištenih gena za razlikovanje spolnih kromosoma, a razlika AMELX i AMELY temelji se na dužini prvog introna na genu. Ženska osoba pokazati će homozigotnost, a muška heterozigotnost za gen. SRY gen smješten je na kraćem kraku kromosoma Y na poziciji 11.2 (Yp11.2) i određuje razvoj embrija u mušku jedinku, a njegovom prisutnošću u uzorku zaključuje se da je osoba muškog spola (George i sur. 2013).

Suvremene metode uglavnom se temelje na multipleks STR analizama X i Y gena, SNP (*single nucleotide polymorphism*) pirosekvenciranju ili analizi Y STR haplotipova koji se vjerno nasljeđuju s oca na sina, a u populaciji je prisutan velik broj polimorfizama. Kod primjera transplantacijskih kimera, ako su donor i primatelj istog genetičkog uzorka a različitog spola, pri analizi može doći do pogrešne determinacije, a neposredno nakon transplantacije STR-ovi u krvi će biti nepodudarni sa onima u korijenu kose, iako se zapravo radi o istoj osobi (von Wurmb-Schwark i sur. 2007). Žene koje su prethodno rodile sinove, zbog mogućeg fetalnog mikrokimerizma prilikom analize može dovesti do pogrešne identifikacije spola ako se u uzorku našao veliki broj muških fetalnih stanica. Prilikom analize uzorka prirodne 46,XX/46,XY kimere može doći do dvosmislenih rezultata pa je potrebna uporaba metoda visoke razlučivosti, poput npr. multipleks STR tipizacije Y kromosoma ili pirosekvenciranja. No ipak, u većini slučajeva forenzički analitičar ne zna unaprijed detalje o uzorku i osobi kojoj pripada te neće nužno odmah koristiti takve metode.

Raširenijom uporabom STR analize, američki laboratoriji koji provode testove roditeljstva su pronašli nekoliko kimera. Problemi nastaju kad analiza uzorka kimere daje rezultate koji se mogu odbaciti jer su naizgled kontaminirani, poput pojave više od dva signala na lokusu. Uz to, uzorak uzet iz dva različita tkiva kimernog pojedinca mogu pokazati različite rezultate, to jest u jednom tkivu mogu biti prisutne stanice dviju genetički različitih populacija, a u drugom samo jedna od tih populacija stanica. Nadalje, DNA populacije stanica prisutne u malom postotku se možda ne uspije amplificirati. Konačno, u slučaju kimere vjerojatnost roditeljstva zahtijeva atipičnu kalkulaciju (Wenk, 2018). Dva poznata slučaja žena za koje se smatralo da nisu majke svoje djece su na kraju pokazala da su te žene zapravo prirodne kimere (Yu i sur. 2002). Sami rezultati koji su govorili da nisu majke svoje djece su od početka bili upitni obzirom da su za više od jednog djeteta žene dobiveni slični rezultati, a slučajevi gdje je

majčinstvo usitinu isključeno su iznimno rijetki i vežu uz slučajeve zamjene djece pri rođenju ili otmici djece.

## **5. ZAKLJUČAK**

Nova saznanja o kimerama sporo su se akumulirala zbog ograničenja detekcijskih metoda, koja su u samim počecima ovisila isključivo o fenotipskim fizičkim asimetrijama pojedinaca ili slučajnim otkrićima nakon uočene miješane aglutinacije kod determinacije krvnih grupa. Upravo je s novim molekularnim metodama detekcije došlo i do otkrića novih vrsta kimeri kao što su mikrokimere i ijetrogene kimere. S daljnjim razvojem metoda i porastom interesa za istraživanjem kimeri ponajprije zbog biomedicinskog aspekta, vjerojatno je da će broj opisanih slučajeva kimerizma nastaviti ubrzano rasti. Moguće je da je genetički kimerizam puno češći fenomen kod čovjeka nego što se prije smatralo, pogotovo u usporedbi sa vremenom kada su tek opisivani prvi slučajevi u 20. stoljeću. Mjesta za razvoj i usavršavanje detekcije ima mnogo, a od značajnog je interesa kad se uzme u obzir da se još ne može sa sigurnošću reći koje sve točno implikacije na zdravlje pojedinca nosi kimerizam. Bolje uzorkovanje, različitost tkiva iz kojih se uzorci uzimaju, bolja osjetljivost analitičkih metoda, neinvazivne metode prikupljanja uzorka i primjena sekvencioniranja sljedeće generacije samo su neki od načina kojima bi se detekcija kimerizma mogla poboljšati.

## **6. LITERATURA**

- Bagshaw, A. T. M. (2017). Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Genome Biology and Evolution*, 9(9), 2428–2443.  
<https://doi.org/10.1093/gbe/evx164>
- Baldwin, V. J. (1994). Intertwin Vascular Anastomoses. In *Pathology of Multiple Pregnancy* (pp. 215–275). [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9514-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9514-0_9)
- Bianchi, D. W., Farina, A., Weber, W., Delli-Bovi, L. C., DeRiso, M., Williams, J. M., & Klinger, K. W. (2001). Significant fetal-maternal hemorrhage after termination of pregnancy: Implications for development of fetal cell microchimerism. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 184(4), 703–706. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.111072>
- Boklage, C. E. (2006). Embryogenesis of chimeras, twins and anterior midline asymmetries. *Human Reproduction*, 21(3), 579–591. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei370>
- Chen, K., Chmait, R. H., Vanderbilt, D., Wu, S., & Randolph, L. (2013). Chimerism in monochorionic dizygotic twins: Case study and review. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 161(7), 1817–1824. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35957>
- Choi, E. J., Kim, S. R., Kim, Y. J., Kang, S. M., Kim, G. Y., Kim, J. H., & Lee, Y. J. (2019). Clinical and Genetic Analysis of an Infertile Male with 46,XX/46,XY Chimerism. *Andrologia*, 51(3), 1–9. <https://doi.org/10.1111/and.13215>
- Cirello, V., Perrino, M., Colombo, C., Muzza, M., Filopanti, M., Vicentini, L., ... Fugazzola, L. (2010). Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: studies in peripheral blood and tissues. *International Journal of Cancer*, 126(12), NA-NA.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.24993>
- Cirello, V., Recalcati, M. P., Muzza, M., Rossi, S., Perrino, M., Vicentini, L., ... Fugazzola, L. (2008). Fetal Cell Microchimerism in Papillary Thyroid Cancer: A Possible Role in Tumor Damage and Tissue Repair. *Cancer Research*, 68(20), 8482–8488.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0672>
- Conlin, L. K., Thiel, B. D., Bonnemann, C. G., Medne, L., Ernst, L. M., Zackai, E. H., ...

- Spinner, N. B. (2010). Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Human Molecular Genetics*, 19(7), 1263–1275. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq003>
- De la Chapelle, A., Schröder, J., Rantanen, P., Thomasson, B., Niemi, M., Tiilikainen, A., ... Robson, E. B. (1974). Early fusion of two human embryos? *Annals of Human Genetics*, 38(1), 63–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4460866>
- de Man, A. J. M., Foolen, W. J. G., van Dijk, B. A., Kunst, V. A. J. M., & de Witte, T. M. (1988). A Fluorescent Microsphere Method for the Investigation of Erythrocyte Chimaerism after Allogeneic Bone Marrow Transplantation Using Antigenic Differences. *Vox Sanguinis*, 55(1), 37–41. <https://doi.org/10.1159/000461828>
- Dierselhuis, M. P., & Goulmy, E. (2013). We are all born as microchimera. *Chimerism*, 4(1), 18–19. <https://doi.org/10.4161/chim.23348>
- Draper, N. L. (2018). *Chimerism - A Clinical Guide* (1st ed.; N. L. Draper, ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89866-7>
- Farhud, D. D., & Zarif Yeganeh, M. (2013). A brief history of human blood groups. *Iranian Journal of Public Health*, 42(1), 1–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514954>
- Fausser, B. C., Devroey, P., & Macklon, N. S. (2005). Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *The Lancet*, 365(9473), 1807–1816. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66478-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66478-1)
- Fitzgerald, P. H., Brehaut, L. A., Shannon, F. T., & Angus, H. B. (1970). Evidence of XX-XY sex chromosome mosaicism in a child with true hermaphroditism. *Journal of Medical Genetics*, 7(4), 383–388. <https://doi.org/10.1136/jmg.7.4.383>
- Gadi, V. K., & Nelson, J. L. (2007). Fetal Microchimerism in Women with Breast Cancer. *Cancer Research*, 67(19), 9035–9038. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4209>
- Gammill, H. S., & Nelson, J. L. (2010). Naturally acquired microchimerism. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2–3), 531–543.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.082767hg>

- George, R., Donald, P. M., Nagraj, S. K., Idiculla, J. J., & Hj Ismail, R. (2013). The impact of chimerism in DNA-based forensic sex determination analysis. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 20(1), 76–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23785258>
- Gladstone, R. M. (1969). Development and Significance of Heterochromia of the Iris. *Archives of Neurology*, 21(2), 184–192. <https://doi.org/10.1001/archneur.1969.00480140084008>
- Hare, W. C. D., & Singh, E. L. (1979). Cytogenetics in animal reproduction. *Cytogenetics in Animal Reproduction*. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19790147481>
- Hatzimichael, E., & Tuthill, M. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*, 3, 105–117. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S6815>
- I. Dunsford, C. C. Bowley, Ann M. Hutchison, Joan S. Thompson, R. S., & Race, and R. R. (1953). *A Human Blood-Group Chimera*. 2(4827), 50–51. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/20311859>
- Kamper-Jørgensen, M., Biggar, R. J., Tjønneland, A., Hjalgrim, H., Kroman, N., Rostgaard, K., ... Gadi, V. K. (2012). Opposite effects of microchimerism on breast and colon cancer. *European Journal of Cancer*, 48(14), 2227–2235. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.006>
- Khan, F., Agarwal, A., & Agrawal, S. (2004). Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplantation*, 34(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704525>
- Lee, J. T., & Bartolomei, M. S. (2013). X-Inactivation, Imprinting, and Long Noncoding RNAs in Health and Disease. *Cell*, 152(6), 1308–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.016>
- Lepez, T., Vandewoestyne, M., & Deforce, D. (2013). Fetal microchimeric cells in autoimmune thyroid diseases: harmful, beneficial or innocent for the thyroid gland? *Chimerism*, 4(4), 111–118. <https://doi.org/10.4161/chim.25055>

- Lipsker, D., Flory, E., Wiesel, M.-L., Hanau, D., & de la Salle, H. (2008). Between Light and Dark, the Chimera Comes Out. *Archives of Dermatology*, 144(3), 327–330.  
<https://doi.org/10.1001/archderm.144.3.327>
- Lissauer, D. M., Piper, K. P., Moss, P. A. H., & Kilby, M. D. (2009). Fetal microchimerism: the cellular and immunological legacy of pregnancy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, e33. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001264>
- Lorthongpanich, C., Cheow, L. F., Balu, S., Quake, S. R., Knowles, B. B., Burkholder, W. F., ... Messerschmidt, D. M. (2013). Single-Cell DNA-Methylation Analysis Reveals Epigenetic Chimerism in Preimplantation Embryos. *Science*, 341(6150), 1110–1112.  
<https://doi.org/10.1126/science.1240617>
- Mahr, B., Granofszky, N., Muckenhuber, M., & Wekerle, T. (2017). Transplantation Tolerance through Hematopoietic Chimerism: Progress and Challenges for Clinical Translation. *Frontiers in Immunology*, 8, 1762. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01762>
- Malan, V., Vekemans, M., & Turleau, C. (2006). Chimera and other fertilization errors. *Clinical Genetics*, 70(5), 363–373. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00689.x>
- Maloney, S., Smith, A., Furst, D. E., Myerson, D., Rupert, K., Evans, P. C., & Nelson, J. L. (1999). Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(1), 41–47. <https://doi.org/10.1172/JCI6611>
- Minowada, S., Hara, M., Shinohara, M., Ishida, H., Fukutani, K., Isurugi, K., ... Kishi, K. (1982). Investigation of genetic markers in a true hermaphrodite with chi 46,XX/46,XY. *Human Genetics*, 60(4), 376–378. <https://doi.org/10.1007/bf00569224>
- Miura, K., & Niikawa, N. (2005). Do monozygotic dizygotic twins increase after pregnancy by assisted reproductive technology? *Journal of Human Genetics*, 50(1), 1–6.  
<https://doi.org/10.1007/s10038-004-0216-6>
- Molho-Pessach, V., & Schaffer, J. V. (2011). Blaschko lines and other patterns of cutaneous mosaicism. *Clinics in Dermatology*, 29(2), 205–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.09.012>



- Nelson, J. L. (2012). *The Otherness of Self: Microchimerism in Health and Disease*.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2012.03.002>
- Nelson, J. L., Furst, D. E., Maloney, S., Gooley, T., Evans, P. C., Smith, A., ... Bianchi, D. W. (1998). Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *The Lancet*, 351(9102), 559–562. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)08357-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)08357-8)
- Pasquini, M. C., Wang, Z., Horowitz, M. M., & Gale, R. P. (2010). 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clinical Transplants*, 87–105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21696033>
- Platon. (n.d.). *Država* (3rd ed.; V. K. Albin Vihar, Branko Pavlović, ed.). Retrieved from <https://katalog.kgz.hr/pagesResults/bibliografskiZapis.aspx?&currentPage=1&searchById=1&sort=0&spid0=1&spv0=država&xm0=1&selectedId=13000989>
- Raspa, R. W., Subramaniam, A. P., & Romas, N. A. (1986). True hermaphroditism presenting as intermittent hematuria and groin pain. *Urology*, 28(2), 133–136.  
[https://doi.org/10.1016/0090-4295\(86\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0090-4295(86)90105-6)
- Sayegh, M. H., Fine, N. A., Smith, J. L., Rennke, H. G., Milford, E. L., & Tilney, N. L. (1991). Immunologic Tolerance to Renal Allografts after Bone Marrow Transplants from the Same Donors. *Annals of Internal Medicine*, 114(11), 954. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-114-11-954>
- Shanfield, I., Young, R. B., & Hume, D. M. (1973). True hermaphroditism with XX-XY mosaicism: report of a case. *The Journal of Pediatrics*, 83(3), 471–473.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(73\)80278-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80278-1)
- Sperling, M. (2008). *Pediatric endocrinology*. Saunders/Elsevier.
- Stanley M. Gartler, S. H. W. and E. G. (1962). *An XX / XY Human Hermaphrodite Resulting from Double Fertilization* Author ( s ): Stanley M . Gartler , Sorrell H . Waxman and Eloise Giblett Source : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , . 48(3), 332–335. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/71203>

- Tarkowski, A. K. (1998). Mouse chimaeras revisited: recollections and reflections. *The International Journal of Developmental Biology*, 42(7), 903–908. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853820>
- Thomas E. Starzl, Anthony J. Demetris, Noriko Murase, Massimo Trucco, Angus W. Thomson, Abdul S. Rao, and J. J. F. (1997). *Chimerism after organ transplantation.pdf*. 7.
- Thomas, I. T., Frias, J. L., Cantu, E. S., Lafer, C. Z., Flannery, D. B., Graham, J. G., & Jr. (1989). Association of pigmentary anomalies with chromosomal and genetic mosaicism and chimerism. *American Journal of Human Genetics*, 45(2), 193–205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2667350>
- Tippett, P. (1983). Blood Group Chimeras: A Review. *Vox Sanguinis*, 44(6), 333–359. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1983.tb03657.x>
- van den Wijngaard, J. P. H. M., Lopriore, E., van der Salm, S. M. A., Schaap, A. H. P., Vandenbussche, F. P. H. A., DeRuiter, M. C., & van Gemert, M. J. C. (2007). Deep-hidden anastomoses in monochorionic twin placentae are harmless. *Prenatal Diagnosis*, 27(3), 233–239. <https://doi.org/10.1002/pd.1652>
- Van Dijk, B. A., Boomsma, D. I., & De Man, A. J. M. (1996). Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *American Journal of Medical Genetics*, 61(3), 264–268. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19960122\)61:3<264::AID-AJMG11>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19960122)61:3<264::AID-AJMG11>3.0.CO;2-R)
- Vanzyl, B., Planas, R., Ye, Y., Foulis, A., de Krijger, R. R., Vives-Pi, M., & Gillespie, K. M. (2010). Why are levels of maternal microchimerism higher in type 1 diabetes pancreas? *Chimerism*, 1(2), 45–50. <https://doi.org/10.4161/chim.1.2.13891>
- von Wurmb-Schwark, N., Bosinski, H., & Ritz-Timme, S. (2007). What do the X and Y chromosomes tell us about sex and gender in forensic case analysis? *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 14(1), 27–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcfm.2005.09.003>
- Wenk, R. E. (2018). A review of the biology and classification of human chimeras. *Transfusion*, 58(8), 2054–2067. <https://doi.org/10.1111/trf.14791>
- Yordam, N., Alikasifoglu, A., Kandemir, N., Caglar, M., & Balci, S. (2001). True

hermaphroditism: clinical features, genetic variants and gonadal histology. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism : JPEM*, 14(4), 421–427.

<https://doi.org/10.1515/jpem.2001.14.4.421>

Yu, N., Kruskall, M. S., Yunis, J. J., Knoll, J. H. M., Uhl, L., Alosco, S., ... Yunis, E. J. (2002). Disputed Maternity Leading to Identification of Tetragametic Chimerism. *New England Journal of Medicine*, 346(20), 1545–1552. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013452>

Yunis, E. J., Zuniga, J., Romero, V., & Yunis, E. J. (2007). Chimerism and tetragametic chimerism in humans: implications in autoimmunity, allorecognition and tolerance. *Immunologic Research*, 38(1–3), 213–236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917028>

## **7. SAŽETAK**

Genetička kimera označava jedinku u čijem su organizmu prisutne populacije genetički različitih stanica. Prvi slučajevi opisani su polovicom 20. stoljeća, a detekcija kimernih pojedinaca pratila je poboljšanje i razvoj metoda njihove detekcije. Prvo je to bila serologija krvnih grupa i primjećivanje morfoloških karakteristika, potom citogenetika, a sada su to molekularne metode tipizacije. Danas je poznato nekoliko tipova kimerizma obzirom na mehanizam nastanka, a neki oblici su relativno nedavno otkriveni upravo zbog napretka tehnologije i metoda detekcije. Sve češće spominjanje kimera u kontekstu biomedicinskih istraživanja i forenzičkih analiza potiče potrebu za daljnjim razvojem metoda detekcije kako bi se omogućilo sustavno proučavanje i praćenje ove pojave kod čovjeka.

## **8. SUMMARY**

A genetic chimera means that an individual carries two genetically distinct lines within its cells. The first cases were described in the middle of the 20th century and the detection of such individuals closely followed advancement and development of new methods of detection. First it was blood group serology and physical symptoms, then cytogenetic methods and now, molecular typing methods. Today, several types of chimerism are known and all differ by their mechanism of origin, some of which were relatively recently discovered because of the mentioned technological advancement of new detection methods. Increasing interest for chimerism in the context of biomedical research and forensic analysis encourages need for further development of more precise detection methods to enable and systematic study and tracking of this phenomena in humans.